

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-507209

⑬ 公表 平成5年(1993)10月21日

⑭ Int.Cl.⁵
C 12 N 15/62
C 07 K 13/00

識別記号
ZNA

庁内整理番号
8619-4H
8931-4B

審査請求 有
予備審査請求 有

C 12 N 15/00

部門(区分) 1(1)

A※

(全 15 頁)

⑮ 発明の名称 チオレドキシンおよびチオレドキシン様分子に対するペプチドおよび蛋白融合

⑯ 特 願 平4-507259

⑰ 翻訳文提出日 平5(1993)4月20日

⑱ 出 願 平4(1992)2月6日

⑲ 国際出願 PCT/US92/00944

⑳ 国際公開番号 WO92/13955

㉑ 国際公開日 平4(1992)8月20日

優先権主張 ㉒ 1991年2月6日 ㉓ 米国(US) ㉔ 652,531

㉕ 発 明 者 マツコイ、ジョン

アメリカ合衆国01876 マサチューセッツ、リーディング、バイ
ン・リッジ・ロード 63番

㉖ 出 願 人 ジェネティックス・インステイ

アメリカ合衆国02140 マサチューセッツ、ケンブリッジ、ケン
プ・インコーポレイテツ リッジパーク・ドライブ 87番

㉗ 代 理 人 弁理士 青 山 蓀 外1名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), MC(広
域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

- (1) 選択した異種蛋白をコード化するDNA配列に融合したチオレドキシン様蛋白をコード化するDNAを含む、融合蛋白をコード化するDNA配列。
- (2) チオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列が融合蛋白のアミノ末端を含む、請求項1記載のDNA配列。
- (3) チオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列が融合蛋白のカルボキシ末端を含む、請求項1記載のDNA配列。
- (4) チオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列がエシエリキア・コリ(E. Coli) チオレドキシンおよびひとチオレドキシンからなる群から選ばれる、請求項1、2または3記載のDNA配列。
- (5) 選択した蛋白をコード化するDNA配列がIL-11、IL-6、マクロファージ阻害蛋白1αおよび骨形成形成蛋白2からなる群から選ばれる、請求項1、2または3記載のDNA配列。
- (6) さらにチオレドキシン様蛋白をコード化するDNAと選択した異種蛋白をコード化するDNAの間に融合したリンカーDNA配列を含む、請求項1、2または3記載のDNA配列。
- (7) 配列が、選択した宿主細胞中における融合蛋白の発現を指示する能力をもつ適当な発現制御配列の制御下にある、請求項1-6のDNA配列を含むプラスミドDNA分子。
- (8) 請求項7記載のプラスミドで形質転換されるか、またはそれをそのゲノム中へ組み込まれた、エシエリキア・コリ(E. Coli) 宿主細胞。
- (9) (a) 適当な条件下、培地中で請求項8記載の宿主細胞を培養し、
(b) それにより産生された融合蛋白を上記培地から採取し、
(c) 上記融合蛋白から選択した異種蛋白を切断し、
(d) 選択した異種蛋白を分離することを含む
選択した異種蛋白の製造法。

- (10) 請求項9記載の方法で製造されるIL-11蛋白。
- (11) 請求項9記載の方法におけるチオレドキシンの使用。

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

チオレドキシシンおよびチオレドキシシン様分子に対するペプチドおよび蛋白融合

この発明は、総括的には原核生物および真核生物細胞における融合蛋白の製造に関するものである。さらに具体的には、この発明は、選択した異種ペプチドまたは蛋白の配列に融合したチオレドキシシンまたはチオレドキシシン様配列を含む組換え融合配列の宿主細胞における発現、並びに上記融合分子の使用による組換え蛋白およびペプチドの生産性、活性、安定性または溶解性の増強に関するものである。

発明の背景

多くのペプチドおよび蛋白は、多様な発現系、例えば様々な株の細菌、真菌、は乳類または昆虫細胞における組換え技法により製造される。しかしながら、異種遺伝子発現に関して細菌を宿主細胞として使用すると、多くの場合幾つかの問題が発生する。

例えば、小ペプチドをコード化する異種遺伝子は、細菌ではうまく発現しないことが多い。ほとんどの小ペプチドは、それらのサイズ故に、安定した可溶性立体配座をとり得ず、宿主細胞に存在するプロテアーゼおよびペプチダーゼによる細胞内分解にふされる。エシェリキア・コリまたは他の細菌宿主において直接発現される場合に自発的に蓄積するそれらの小ペプチドは、通常不溶性または「細胞封入体」フラクションから見出しされ、その存在故にそれらは生物学的または生化学的検定でのスクリーニング目的に関してほとんど役に立たない。

さらに、小ペプチドが細胞封入体で製造されない場合でも、新規薬剤または酵素阻害剤に関する候補としての組換え技法による小ペプチドの製造は、さらに別の問題に遭遇する。小型線状ペプチドでも、立体配座の自由さの度合が高いため、莫大な数の可能な構造をとり得る。すなわち、「活性」ペプチド立体配座は自由な溶液中でとられる選択すべき多くの構造のうちの唯一のものであるため、小ペプ

他の潜在的な利益を呈することが多い。エシェリキア・コリにおける経験は、高レベルの遺伝子発現の達成における重大因子が、翻訳開始効率であることを示した。エシェリキア・コリにおける翻訳開始作用は、目的異種ペプチドまたは蛋白配列の開始メチオニンコドンを含むシグナル配列に対して非常に敏感であるが、この現象を支配する規則は明らかではない。この理由のため、多くの融合相手蛋白のアミノ末端における配列の融合は、予測不可能な形で発現レベルに影響を及ぼす。さらに、エシェリキア・コリには融合相手蛋白へのアミノまたはカルボキシル末端ペプチド伸長体を分解する多数のアミノおよびカルボキシーペプチダーゼが存在するため、若干の既知融合相手は安定した融合蛋白製造に関する低い成功率を示す。

組換え発現系により製造された蛋白の精製は、深刻な難題であることが多い。組換え蛋白の異種製品を製造する新規でより容易な方法が永続的に要望されているが、当業界で現在使用されている若干の融合相手は精製プロセスを容易にする固有の特性を全くもたない。従って、組換え発現系の技術分野では、研究、診断および治療適用における使用を目的とする安定した可溶性ペプチドおよび蛋白の製造および精製に関する新規組成物および方法が依然として要望されている。

発明の要旨

一態様において、本発明は、選択した異種ペプチドまたは蛋白に融合したチオレドキシシン様蛋白配列を含む融合配列を提供する。ペプチドまたは蛋白は、チオレドキシシン様配列のアミノ末端、チオレドキシシン様配列のカルボキシル末端またはチオレドキシシン様配列内(例、チオレドキシシンの活性部位ループ内)に融合され得る。この発明による融合配列は、所望によりチオレドキシシン様配列および選択したペプチドまたは蛋白間にリンカーペプチドを含み得る。このリンカーは、必要な場合、チオレドキシシン様分子および選択したペプチドまたは蛋白間の立体障害を阻止し得るアミノ酸の選択した開裂部位または伸長部分を提供する。

別の態様として、本発明は、所望の宿主細胞において融合蛋白の発現を指示し得る発現制御配列を伴い、その制御下で上記融合配列をコード化するDNA分

子は、「望ましい」アミノ酸配列を有し得るが、検定では非常に低い活性しか示し得ない。このことは、有効な研究および治療用途を目的とする組換え技法による小型異種ペプチドの製造時に直面する別の問題点を提示する。

また、細胞封入体形成は、異種蛋白の遺伝子が細菌細胞で発現される場合に観察されることが多い。これらの封入体は、通常異種蛋白を可溶化および再生するために、経験的に決定された条件下、各場合とも不確実さを伴うさらに別の操作を必要とする。

これらの追加的方法が成功しない場合、生物活性を保持している蛋白はほとんどまたは全く宿主細胞からは採取され得ない。さらに、これらの追加的方法は技術的に困難な場合が多く、治療、診断または他の研究用途を目的とする組換え蛋白の実際の製造は極めて高い費用を要する。

これらの問題を克服するため、当業界では、望ましい異種ペプチドまたは蛋白との融合「相手」としてある種のペプチドまたは蛋白を使用することにより、細胞発現系における融合蛋白としての小型ペプチドまたは大型蛋白の組換えの発現および/または分泌を可能にした。それらの融合相手の中には、lacZおよびtrpE融合蛋白、麦芽糖結合蛋白融合体、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合蛋白が含まれる[一般的には、「カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」、第2巻、補遺10、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ出版、ニューヨーク、ニューヨーク、16.4.1-16.8.1頁(1990)、およびスミス等、「ジーン」67:31-40(1988)参照]。アメリカ合衆国特許4801536は、細菌細胞における異種遺伝子の製造および融合蛋白として培養培地へのその分泌を可能にする目的蛋白との細胞フラグリン蛋白の融合を記載している。PCT特許公開WO91/11454は、融合相手としてビオチニル化レニンを用いた融合蛋白を開示している。レニンは、精製カラムに固定化され、分離および開裂を容易にする。

しかしながら、これらの融合相手蛋白のアミノまたはカルボキシル末端における他の蛋白(すなわち融合相手として)への目的ペプチドまたは蛋白の融合は、

子を提供する。

本発明のさらに別の態様は、選択した異種ペプチドまたは蛋白のDNA配列に融合したチオレドキシシン様DNA配列を含むDNA配列により形質転換されたか、または前記配列がそのゲノム中へ組み込まれた宿主細胞である。この融合配列は、望ましくは細胞における融合蛋白の発現を指示する能力をもつ発現制御配列の制御下に置かれる。

さらに別の態様として、本発明は、可溶性組換え蛋白発現の新規増強方法を提供する。この方法では、適当な条件下で上記宿主細胞を培養して、融合蛋白を製造させる。

この方法の一態様では、生成した融合蛋白が細胞質である場合、この細胞を慣用的手段で溶解することにより、可溶性融合蛋白が得られる。さらに好ましくは、細胞質融合蛋白の場合、この方法では、細胞に浸透圧ショックまたは冷凍/解凍処理を適用することにより宿主細胞から融合蛋白を放出させる。この場合、融合蛋白は、エシェリキア・コリの内膜および外膜間に存在する付着ゾーンを介して細胞の内側から選択的に放出される。次いで、融合蛋白は慣用的手段により精製される。

この方法の別の態様において、分泌前導物質を融合蛋白構築物で使用する場合、融合蛋白は、ペリプラスミック抽出物または細胞培養培地から回収され得る。

これらの両方法における追加段階は、慣用的手段によるチオレドキシシン様蛋白からの目的蛋白の開裂である。

以下、本発明の好ましい態様の詳細な記載を熟考すれば、本発明の他の態様および利点は明白である。

図面の要約

図1は、実施例1に記載された、発現プラスミドpALTRXA/EK/IL11ΔPro-581のDNA配列およびその中の融合蛋白に関するアミノ酸配列を示す。

図2は、実施例3記載のチオレドキシシン融合蛋白の構築で使用されるマクロファ

ージ阻害蛋白1 α (MIP-1 α)蛋白のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

図3は、実施例4記載のチオレドキシン融合蛋白の精製で使用する骨形彫成蛋白2(BMP-2)蛋白のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

図4は、実施例5に記載されたエシエリキア・コリのチオレドキシン(trxA)の活性部位ループへのエンチロキナーゼ開裂部位の挿入を示す概略図である。

図5は、実施例5に記載されたエシエリキア・コリのチオレドキシン(trxA)の活性部位ループへの無作為なペプチド挿入を示す概略図である。

図6は、実施例6記載のチオレドキシン融合蛋白の精製で使用するヒトインターロイキン-6(IL-6)蛋白のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

図7は、実施例7記載のチオレドキシン融合蛋白の精製で使用するM-CSF蛋白のDNA配列およびアミノ酸配列を示す。

発明の詳細な記載

この発明によると、通常では限られた量の異種ペプチドまたは蛋白を発現するある種の宿主細胞において安定した可溶性形態を呈する大量の異種ペプチドまたは蛋白の製造が可能となる。この発明によって産生細胞からの融合蛋白の放出が可能となり、細胞の溶解を必要としないため、精製プロセスが合理化される。また、チオレドキシン様配列の内部領域(例、チオレドキシンの活性部位ループ)における小ペプチド挿入を用いることにより、本発明は、分子表面上に接近し得る容易な開裂部位を提供する。また、この発明の融合蛋白は、目的ペプチドまたは蛋白においてその望ましい立体配座を達成させ得る。

本発明によると、組換え体系における発現に関して選択した異種ペプチドまたは蛋白をコード化するDNA配列は、チオレドキシン様DNA配列に融合されることにより宿主細胞において発現される。チオレドキシン様DNA配列は、本明細書では80アミノ酸のアミノ酸配列長にわたってエシエリキア・コリのチオレドキシンのアミノ酸配列と少なくとも18%の相同性を有するアミノ酸配列を特徴とする蛋白または蛋白のフラグメントをコード化するDNA配列として定義される。別法として、チオレドキシンDNA配列は、ひとまたはエシエリキア・コ

リのチオレドキシンの場合と実質的に類似した結晶構造を有する蛋白または蛋白のフラグメントをコード化するDNA配列として定義される。グルタレドキシンのDNA配列は、それらの一配列である。エシエリキア・コリのチオレドキシンのアミノ酸配列は、H. エクルンド等、「EMBOジャーナル」3:1443-1449(1984)に記載されている。エシエリキア・コリのチオレドキシンの3次元構造は、A. ホルムグレン、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」264:13963-13966(1989)の図2に描かれている。ヌクレオチド2242-2568下の図1は、エシエリキア・コリのチオレドキシン蛋白をコード化するDNA配列を含む[リム等、「ジャーナル・オブ・バクテリアロジー」163:311-316(1985)]。当業界の一熟練者に知られているチオレドキシンに関する情報を提供する目的で、最後の3出版物を本明細書中に引用して説明の一部とする。

この発明で有用なチオレドキシン様蛋白の主な例として、エシエリキア・コリのチオレドキシンは次の特徴を有する。エシエリキア・コリのチオレドキシンは11.7kDの小さな蛋白であり、高レベル(>10%, 細胞が10A₆₀₀/mlで溶解される場合15マイクロモルの濃度に対応)まで発現され得る。蛋白の高度発現のための小さなサイズおよび受容力は、高い細胞内濃度の一因となる。さらにエシエリキア・コリのチオレドキシンは、目的ペプチドまたは蛋白への融合に起因する全体的な構造安定性に対する影響を最少限にし得る非常に安定した堅固な構造を特徴とする。

エシエリキア・コリのチオレドキシンの3次元構造は公知である。それは、蛋白の本体から突き出る残基Cys₃₃およびCys₃₄間にある特有の活性部位ループを含め、幾つかの表面ループを含む。この活性部位ループは、固定され得る接近可能な表面ループ領域であり、全体的構造安定性の一因となる蛋白の残りの相互作用には全く関与しない。従って、それは、ペプチド挿入用部位として優れた候補である。エシエリキア・コリのチオレドキシンのアミノおよびカルボキシル両末端は、蛋白表面にあり、容易に接近して融合し得る。

また、エシエリキア・コリのチオレドキシンはプロテアーゼに対して安定している。すなわち、エシエリキア・コリ蛋白としてエシエリキア・コリのプロテアーゼに対する安定性を特徴とするため、エシエリキア・コリのチオレドキシンは、エシエリキア・コリ発現系での使用に望ましいものであり得る。また、エシエリキア・コリのチオレドキシンは、80℃以下の加熱および低pHに対して安定している。この発明で有用なチオレドキシン様DNA配列によりコード化される他のチオレドキシン様蛋白は、相同性アミノ酸配列および類似した物理的および構造的特徴を共有し得る。すなわち、他のチオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列も、この発明によるエシエリキア・コリのチオレドキシンの代わりに使用され得る。例えば、他の種のチオレドキシン、例えばヒトチオレドキシンをコード化するDNA配列も、この発明の組成物および方法中で使用され得る。ひとおよびエシエリキア・コリのチオレドキシンの1次配列およびコンピューター予測による2次構造は、両方とも非常に類似している。また、ひとチオレドキシンは、エシエリキア・コリ蛋白から見出されるものと同じ活性部位ループをもつ。ひとチオレドキシン活性部位ループ中およびアミノおよびカルボキシル末端への挿入は、エシエリキア・コリのチオレドキシンにおける場合と同程度に相容性があり得る。

この発明で使用され得る他のチオレドキシン様配列には、蛋白グルタレドキシンおよびその様々な種の相同体の全部または一部分が含まれる[A. ホルムグレン、前出]。エシエリキア・コリのグルタレドキシンおよびエシエリキア・コリのチオレドキシンは20%未満のアミノ酸相同性を共有するが、2種の蛋白は実際に立体配座および機能的類似性を有する[エクルンド等、「EMBOジャーナル」3:1443-1449(1984)]。

また、蛋白ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)の反復ドメインはエシエリキア・コリのチオレドキシン様と>18%の相同性を共有するため、PDIおよびその様々な種の相同体[J. E. エドマン等、「ネイチャー」317:267-270(1985)]をコード化するDNA配列の全部または一部分もチオレドキシン様DN

A配列として使用され得る。当業界の一熟練者に熟知され利用され得るグルタレドキシンおよびPDIに関する情報を提供する目的で、最後の2出版物を引用して説明の一部とする。

同様に、ホスホイノシチド特異的ホスホリラーゼC(P1-PLC)をコード化するDNA配列、そのフラグメントおよびその様々な種の相同体[C. F. ベネット等、「ネイチャー」334:268-270(1988)]もまた、本発明ではエシエリキア・コリのチオレドキシンとのアミノ酸配列相同性に基づいたチオレドキシン様配列として使用され得る。小胞体蛋白、例えばEtp72をコード化するDNA配列の全部または一部分、またはその様々な種の相同体もまた、アミノ酸配列相同性に基づいたこの発明の目的に合うチオレドキシン様DNA配列[R. A. マッツェラ等、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」265:1094-1101(1990)]として含まれる。別のチオレドキシン様配列は、エシエリキア・コリのチオレドキシンとのアミノ酸配列相同性に基づいた成人T細胞白血病由来の因子(ADF)をコード化するDNA配列の全部または一部分またはその他の種の相同体[N. 若杉等、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ」87:8282-8286(1990)]である。当業界の一熟練者に既知かつ入手可能なP1-PLC、Etp72およびADFに関する情報を提供する目的で、最後の3出版物を本明細書中に引用して説明の一部とする。

上記で具体的には同定されておらず、または恐らくまだ同定もしくは公表されていない他の配列が、エシエリキア・コリのチオレドキシンとのそれらのアミノ酸配列類似性並びにエシエリキア・コリのチオレドキシンおよび他のチオレドキシン様蛋白との特異的な結晶構造類似性に基づいたチオレドキシン様配列として有用であり得ることは、上記で使用されているチオレドキシン様DNA配列の定義から予測される。上記に基づく、当業界の一熟練者であれば、過度の實驗を行わずともこの発明で使用されるチオレドキシン様DNA配列を選択および同定または所望ならば修飾することは当然可能である。例えば、生成した分子の構造

には影響を及ぼさない天然チオレドキシンまたは天然チオレドキシン様配列の一部に為された単純な点突然変異配列は、天然チオレドキシンまたは天然チオレドキシン様配列の対立遺伝子変異型の場合と同様、代替的チオレドキシン様配列である。

ストリンジェントまたはリラックスなハイブリダイゼーション下でエシェリキア・コリのチオレドキシンの配列またはその構造的相同体とハイブリダイズするDNA配列もまた、この発明で使用されるチオレドキシン様蛋白をコード化する。ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、本明細書中では65℃で4XSSCでのハイブリダイゼーション、次いで65℃で1時間0.1XSSC中での洗浄として定義される。別法として、ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、42℃で50%ホルムアミド、4XSSC中でのハイブリダイゼーションとして定義される。非ストリンジェントなハイブリダイゼーションは、本明細書中では50℃で4XSSCでのハイブリダイゼーション、または42℃で30-40%ホルムアミドによるハイブリダイゼーションとして定義される。それら全てのチオレドキシン様配列の使用は、この発明に包含されるものと考えられる。

選択したペプチドまたは蛋白のDNA配列およびチオレドキシン様配列のDNA配列を含む本発明の融合配列の構築は、慣用的遺伝子工学技術を使用する[サンプラック等、「モレキュラー・クローニング。ア・ラボラトリー・マニュアル」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1988)参照]。融合配列は、若干の相異なる方法で製造され得る。例えば、選択した異種蛋白は、チオレドキシン様分子のアミノ末端に融合され得る。別法として、選択した蛋白配列は、チオレドキシン様分子のカルボキシル末端に融合され得る。小ペプチド配列もまた、チオレドキシン様配列の上述の位置のいずれかに融合され、構造的に拘束を受けていない形でそれらを製造し得る。

このチオレドキシン様蛋白に対する目的異種ペプチドまたは蛋白の融合により、ペプチドまたは蛋白の安定性は増強される。アミノまたはカルボキシル末端では、

目的異種ペプチドまたは蛋白への融合は、その融合がいずれの蛋白の天然構造をも不安定にすることのないように行なわれる。さらに、可溶性チオレドキシン様蛋白への融合により、選択した異種ペプチドまたは蛋白の溶解性は改善される。

様々な理由により、ペプチドはチオレドキシン様分子の活性部位ループ内で融合されるのが好ましいと思われる。活性部位ループを囲むチオレドキシンの表面は、非特異的蛋白ジスルフィド・オキシドレダクターゼとしての蛋白の主要機能を保ちながら漸進的に変化するにより、多様な蛋白表面と相互作用し得る。活性部位ループ領域は、強い2次構造のセグメント間に見出され、ペプチド融合に関して多くの利点を呈する。チオレドキシン様蛋白の活性部位ループへ挿入された小ペプチドは、3次構造の維持に関与しない蛋白領域に存在する。従って、前記融合蛋白の構造は当然安定している。以前の研究結果は、エシェリキア・コリのチオレドキシンが活性部位ループに近い位置で2つのフラグメントに開裂され得、まだ蛋白を安定させる第3相互作用は残存していることを示している。

エシェリキア・コリのチオレドキシンの活性部位ループは、配列NH₂...Cys₃₃-Gly-Pro-Cys₃₄...COOHを有する。蛋白の活性ループ部分におけるチオレドキシン様蛋白と選択したペプチドの融合により、両者のペプチドは拘束され、ペプチドの立体配座の自由さの度合は低減化し、従ってペプチドがとる代替的構造の数も低減化する。挿入されたペプチドはシステイン残基により一端で結合し、それが天然チオレドキシンにおける場合と同様に互いにジスルフィド橋を形成し、挿入されたペプチドの立体配座の自由さはさらに制限され得る。

さらに、この発明は、チオレドキシン様蛋白の表面にペプチドを配列させる。すなわち、本発明は、この構造状況において活性部位ループに挿入されたペプチドを提示することにより生物活性ペプチド立体配座に関するスクリーニングおよび他の検定におけるペプチドの使用に関して明確な利点を提供する。

さらに、ループへのペプチドの融合は、エシェリキア・コリのアミノおよびカルボキシルペプチダーゼの作用からそれを保護する。さらに、制限エンドヌクレアーゼ開裂部位RsrIIは、ペプチド融合に関して正確に正しい位置にあるル

ープ領域をコード化するエシェリキア・コリのチオレドキシンDNA配列の部分に既に存在する[図4参照]。RsrIIは、3ヌクレオチド長5'-突出接着末端を残すDNA配列CGG(A/T)CCGを認識する。従って、相補的突出末端をもつDNAは、一配向だけでこの部位に挿入される。

この発明によるチオレドキシン様配列および目的蛋白またはペプチド配列の融合配列は、所望によりチオレドキシン様配列および選択した異種ペプチドまたは蛋白間に挿入されたリンカーペプチドを含む得る。このリンカー配列は、所望ならば、慣用的化学的または酵素的方法により選択的に開裂可能または消化可能なポリペプチドをコード化し得る。例えば、選択した開裂部位は酵素の開裂部位であり得る。酵素の開裂部位の例には、蛋白加水分解酵素、例えばエンテロキナーゼ、第Xa因子、トリプシン、コラゲナーゼおよびトロンビンによる開裂部位がある。別法として、リンカーにおける開裂部位は、選択した化学物質、例えば臭化シアン、ヒドロキシルアミンまたは低pH暴露時に開裂され得る部位であり得る。

選択した開裂部位での開裂により、チオレドキシン融合蛋白から異種蛋白またはペプチドが分離され、成熟異種ペプチドまたは蛋白が得られる。次いで、成熟ペプチドまたは蛋白は、以前に結合していたチオレドキシン様蛋白のポリペプチドフラグメントを全く含まない精製形態で得られる。開裂部位は、この発明の融合配列に有用なリンカーに挿入されても、この発明を制限することはない。当業界でその多くが知られている望ましい開裂部位は全て、この目的に使用され得る。

本発明の融合配列の所望によるリンカー配列は、開裂部位の提供以外の目的にも役立つ。また、リンカーは、チオレドキシン様分子および選択した異種ペプチドまたは蛋白間の立体障害を阻止するのに充分な長さの単純なアミノ酸配列であり得る。

前記のリンカー配列が必要であるか否かは、選択した異種ペプチドまたは蛋白の構造的特徴および生成した融合蛋白が開裂せずとも有用であるか否かにより異

なる。例えば、チオレドキシン様配列がひと配列である場合、選択した蛋白またはペプチドがそこから開裂されずとも、融合蛋白はそれ自体治療薬として有用であり得る。別法として、成熟蛋白配列が自然開裂されている場合、リンカーは全く必要とはされ得ない。

従って、一態様において、この発明の融合配列は、そのアミノまたはカルボキシル末端が選択したペプチドまたは蛋白の配列へ直接融合したチオレドキシン様配列を含む。すなわち、生成した融合蛋白は、可溶性細胞質融合蛋白である。別の態様において、融合配列は、さらにチオレドキシン様配列および選択したペプチドまたは蛋白配列間にはさまれたリンカー配列を含む。また、この融合蛋白は、可溶性細胞質蛋白として製造される。同様に、選択したペプチド配列が活性部位ループ領域またはチオレドキシン様配列内の他の場所に挿入されている場合、細胞質融合蛋白が製造される。

細胞質融合蛋白は、慣用的手段により精製され得る。好ましくは、本発明の新規態様として、この発明の幾つかのチオレドキシン融合蛋白は、チオレドキシンの異常な特性を活かすことにより精製され得る。エシェリキア・コリの細胞質は、硬いペプチドグリカン細胞壁内に存在するペリプラスミク空間により互いに分離された内方および外方の2膜を含む細胞エンベロープにより外部環境から効果的に隔離される。ペプチドグリカン壁は細胞に形状および強度の両方を与える。細胞エンベロープのある位置において、内および外膜が会合し、恐らくは一種になって融合していると思われるペプチドグリカン壁には「ギャップ」(バイエル・パッチ、バイエル・ジャンクションまたは付着部位と様々に呼ばれる)が存在する。M. E. バイエル、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」93:1104-1112(1967)および「ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオロジー」53:395-404(1968)参照。細胞チオレドキシンの大部分は、これらの付着部位で膜の内部表面と緩やかに会合し、突然の浸透圧ショックまたは単純な凍結/解凍方法によりこれらの付着部位を通過して細胞から定量的に放出され得る。C. A. ルンおよびV. P. ビジエツト、「ジャーナル・オブ・バイオロ

ジカル・ケミストリー」257:11424-11430(1982)および「チオレドキシン・アンド・グルタレドキシン・システムズ:ストラクチャー・アンド・ファンクション」165-176(1986)(A. ホルムグレン等編、ラーベン・プレス、ニューヨーク)参照。それより低い程度で、EF-Tu(伸長因子-Tu)の中には同じ方法で放出され得るものもあるが[ジャコブソン等、「バイオケミストリー」15:2297-2302(1976)],ペリプラスミック内容物の場合を除き、莫大な数となるエシェリキア・コリ蛋白の大多数はこれらの処理によって放出され得ない。

エシェリキア・コリの細胞質で製造される限られた数の異種蛋白の浸透圧ショックによる放出については報告されているが[デネフル等、「ジーン」85:499-510(1989)、ジョセフ・アウツン等、「ジーン」86:291-295(1990)、ローゼンバッセル等、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」265:13066-13073(1990)],放出される能力は大多数の異種蛋白が共有することのない稀で望ましい特性である。本発明により記載されているチオレドキシンへの異種蛋白の融合は、上記の通りその発現性、溶解性および安定性を向上させるだけでなく、浸透圧ショックまたは凍結/解凍処理により細胞からそれを放出させ得、その精製を大きく簡易化し得る。場合によって例えばMIPとの融合蛋白のチオレドキシン部分は、付着部位に対する融合蛋白を指向し、これらの処理により前記部位からそれを外部へ放出させ得る。

別の態様において、本発明は、この発明の融合蛋白に枠内で機能し得るように結合した、多くが当業界において公知のものである別の成分、すなわち分送先導配列、例えばphoA、MBP、 β -ラクタマーゼの先導配列を用いることにより、細胞ペリプラスミック空間または培養地への成熟融合蛋白の発現および分泌を可能にする。選択したペプチドまたは蛋白配列がカルボキシル末端またはチオレドキシン様分子のアミノ末端に融合し得る。また、所望によるリンカーは、ペプチドまたは蛋白がカルボキシル末端に融合している場合に存在し得る。この融合配列

構築物は、適当な宿主細胞で発現される場合、細胞質融合蛋白ではなく分泌融合蛋白として発現されることが予測される。しかしながら、安定性、溶解性および高い発現性は、当然これらの様々な代替的具体例のいずれかをを用いて製造される融合蛋白の 数となる。

この発明は、特定タイプの異種ペプチドまたは蛋白に限定されるわけではない。広範囲で多様な異種遺伝子または遺伝子フラグメントが本発明の融合配列の形成には有用である。この発明の組成物および方法は、細胞封入体で発現または細胞および酵母宿主において非常に少量しか発現されないペプチドまたは蛋白に非常に有用であって、異種ペプチドまたは蛋白は、いずれかの発現系においてひとの治療または獣医学的治療、診断または研究適用に有用なあらゆるペプチドまたは蛋白を含み得る。例えば、ホルモン、サイトカイン、成長または阻害因子、酵素、糖鎖または全合成蛋白またはペプチドは、この発明により細胞、酵母、哺乳類または他の真核生物細胞およびそれに適した発現系において生産され得る。

この発明を説明している下記実施例において、この発明により発現される蛋白には、IL-11、MIP-1 α 、IL-6、M-CSF、BMP-2と呼ばれる骨形成誘導因子およびラングム配列を有する様々な小ペプチドがある。これらの蛋白には、チオレドキシンの融合相手無しで発現される場合にエシェリキア・コリでは不安定であるかまたは細胞封入体から見出される蛋白の例が含まれる。

上記融合配列が組み込まれた様々なDNA分子は、この発明による異種ペプチドまたは蛋白の発現用に構築され得る。最低限度でも、この発明による望ましいDNA配列は、所望の宿主細胞における融合蛋白の発現を誘因し得る発現制御配列を随伴し、その制御下にある上記融合配列を含む。例えば、宿主細胞がエシェリキア・コリ株である場合、DNA分子は、望ましくはエシェリキア・コリにおいて機能するプロモーター、リボソーム結合部位を含み、さらに所望により、DNA分子が染色体外である場合、選択可能なマーカー遺伝子および複製開始点を含んでいてもよい。細胞発現に關して当業界ではこれらの成分を含む多くの細胞発現ベクターが知られており、標準分子生物学技術により容易に構築され得る。同

様に、宿主細胞が酵母細胞または哺乳類細胞である場合、公知酵母および哺乳類細胞ベクターおよびベクター成分が使用され得る。

融合配列を含むDNA分子は、当業界で知られている通り、選択した宿主細胞での発現を最適化するように真なるコドンを含ませるべくさらに修飾が加えられ得る。

これらのDNA分子は、唯一のDNA配列に融合した異種蛋白またはチオレドキシン様配列の全コピーに融合した異種蛋白と共に、さらにチオレドキシン様DNA配列の多数のコピーを含み得る。また、選択した宿主の染色体へチオレドキシン様/異種ペプチドまたは蛋白コード化融合配列を組み込むことにより、天然チオレドキシン様配列を置換または複製することも可能であり得る。

本発明に適した宿主細胞は、好ましくは細菌細胞である。例えば、エシェリキア・コリの様々な株(例、HB101、W3110および下記実施例で使用される株)は、バイオテクノロジー分野では宿主細胞としてよく知られている。下記実施例で使用されるエシェリキア・コリ株G1724は、下記で詳記されている通り(アメリカ)合衆国微生物保管所に寄託されている。また、バチラス・サチリス、シュドモナスの様々な株および他の細菌もこの方法において使用され得る。

また、当業界の熟練者に知られている酵母の多くの株および他の真核生物細胞も、本発明のペプチド発現用宿主細胞として有用であり得る。同様に、公知は哺乳類細胞もまたこれらの融合蛋白の発現において使用され得る。

この発明の融合蛋白を製造するため、宿主細胞は、望ましくは融合蛋白の発現を誘因し得る発現制御配列の制御下、選択した異種ペプチドまたは蛋白のDNA配列に融合したチオレドキシン様DNA配列を含むDNA分子により形質転換されるか、またはそれがそのゲノムへ組み込まれている。次いで、融合蛋白製造に適した公知条件下で宿主細胞を培養する。融合蛋白が細胞の細胞質で蓄積される場合、それは慣用的細胞溶解技術により放出され、選択的沈殿、可溶性およびカラム・クロマトグラフィー方法を含む慣用的方法により精製され得る。分泌

先導成分が融合分子に組み込まれていると、融合蛋白がペリプラスミック空間または生長地へ分泌される場合に實質的精製が達成される。

別法として、細胞質チオレドキシン融合蛋白の場合、浸透圧ショックまたは凍結/解凍方法により細胞からの選択的放出が達成され得る。たいいてい用途においては依然として最終精製が要求されるが、これらの方法により生成された製品における融合蛋白の初期純度は、慣用的全細胞リザイトで得られる純度よりも優れており、均一性の達成に必要とされる後続精製段階の数は減少する。典型的浸透圧ショック方法では、融合蛋白を含むバックした細胞を、EDTAを含み、通常浴液、例えば20%v/vの含有量に高い容量オスモル濃度を有する緩衝液、容易には細胞質膜と交差し得ない緩衝液に水上で再懸濁する。水上での短いインキュベーション中、水が浸透圧勾配の低い方へと細胞質から移動すると細胞は原形質分離する。次いで、細胞を低オスモル濃度の緩衝液へ転換すると、浸透圧再平衡中にバイエル・パッチに局在するペリプラズムおよび蛋白の両内容物は外部へ放出される。この放出後の簡単な遠心分離により、融合蛋白製品から細胞由来の汚染物質の大部分が除去される。別法として、凍結/解凍方法では、まずEDTAを含む緩衝液に融合蛋白を含むバックした細胞を再懸濁し、次いで冷凍する。続いて、冷凍細胞を高液を解凍させることにより、融合蛋白放出が行なわれる。汚染物質の大部分は遠心分離段階により上記要領で除去され得る。融合蛋白は、公知の慣用的方法によりさらに精製される。

これらの処理によって、細胞培養物を溶解せずとも典型的には融合蛋白の少なくとも30%が放出される。広範囲の蛋白に前記技術を用いても一般的には成功しないことが多いため、かなりの量の広範囲種類のチオレドキシン融合蛋白の放出におけるこれらの方法の成果は驚くべきものである。他の融合蛋白系によって要求される精製方法よりも著しく簡単に費用も少なくて済む前記処理によりこれらの融合蛋白が實質的に精製され得ることから、本発明の融合蛋白にはエシェリキア・コリにおける蛋白製造に使用される他のシステムを凌ぐ顕著な利点が与えられ得る。

生成した融合蛋白は安定性および可溶性があり、異種ペプチドまたは蛋白はその生物活性を保持していることが多い。異種ペプチドまたは蛋白は、上記で検討した通り、所望によりチオレドキシンの融合蛋白から開裂により分離され得る。

この発明の組成物および方法の具体的および説明の態様では、エシェリキア・コリのチオレドキシンの遺伝子はクローン化され、エシェリキア・コリ発現系に組み込まれる。発現プラスミドpALtrxA-781を構築した。pALtrxA/EK/IL11ΔPro-581と呼ばれるチオレドキシンの配列に融合したIL-11を含むこのプラスミドは、後記実施例1および図1に記載されている。異なるリボソーム結合部位を含むこのプラスミドの修飾バージョンは他の実施例で使用され、実施例3に具体的に記載されている。他の慣用的ベクターもこの発明では使用され得る。本発明は、これらの実施例に記載されたプラスミドに限定されるわけではない。

プラスミドpALtrxA-781(修飾IL-11を伴わない)は、エシェリキア・コリ宿主株G1724におけるチオレドキシンの全細胞蛋白の>10%の量を指令する。実施例2ないし6は、このプラスミドの使用によって、ポリペプチドであるBMP-2、IL-6およびMIP-1αとのチオレドキシンの融合蛋白を形成および発現させる方法を記載している。

明は、他の方法では細菌宿主細胞において低レベルでしか製造されないある種の望ましい治療用蛋白、例えばIL-11の高レベルの発現を可能にする。

また、この発明は、特に異種蛋白自体が熱安定性である場合、融合蛋白に熱安定性を付与し得る。チオレドキシンのように恐らくは全チオレドキシンの融合蛋白は80℃以下で熱安定性であるため、本発明は、チオレドキシンの融合蛋白によっては初期有効製剤段階としての単純な熱処理の使用を可能にする場合がある。

治療または他の用途に関して融合蛋白からの開裂時における高レベルの選択した異種蛋白またはペプチドの提供に加えて、本発明の融合蛋白または融合ペプチドはそれら自体治療薬として有用であり得る。さらに、チオレドキシンの融合蛋白は、生物活性ペプチド送達用ベクターを提供し得る。一例として、ひとチオレドキシンのようにひとにおいて抗原性を示さないため、ひとチオレドキシンの本発明融合蛋白は、それが融合される生物活性ペプチドのひとへの送達用ベクターとして有用であり得る。ひとチオレドキシンの融合蛋白は細胞内蛋白であるため、ひとチオレドキシンの融合蛋白はエシェリキア・コリ細胞内発現系で製造され得る。すなわち、この発明はまた、許容し得るチオレドキシンの融合蛋白との融合蛋白形態での患者への生物活性ペプチドまたは蛋白の送達方法を提供する。

また本発明は、潜在的酵素阻害、ホルモン/生長因子アゴニストおよびホルモン/生長因子拮抗活性に関してランダムペプチドのライブラリーをスクリーニングするための方法および試薬を提供する。また、レセプター結合部位、基質結合部位、燐酸化/修飾部位、プロテアーゼ開裂部位およびエピトープを含め、潜在的興味の対象である領域に関する既知蛋白配列の地図作製方法および試薬も提供される。

チオレドキシンのランダムペプチド融合蛋白を発現する細菌コロニーは、プローブとして放射性標識蛋白、例えばホルモンまたは生長因子を用いてスクリーニングされ得る。このタイプのスクリーンから生じる陽性は、レセプター結合部位の標識を固定し、治療用途を有する化合物の設計が誘導され得る。また、チオレドキシンのランダムペプチド融合蛋白を発現する細菌コロニーは、天然活性ホ

活性部位ループに挿入された小ペプチドの発現の一例として、異種プロテアーゼ・エンテロキナーゼ[レイバニクスおよびライト、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」254:1077-1083(1979)]に関する開裂部位を含む13アミノ酸リンカーペプチド配列がチオレドキシンの活性部位ループに融合されたpALtrxA-781の誘導体が構築された。このプラスミド(pALtrxA-EK)は、融合蛋白として全細胞蛋白の>10%の量を指令する。融合蛋白は全て可溶性であり、それが恐らくは「天然」3次構造をとっていたことを示している。同様に、それは80℃での長いインキュベーションに対して野生型チオレドキシンの同程度に安定しており、チオレドキシンの強い3次構造が活性部位ループへの挿入により損なわれなかったことを示唆している。融合蛋白はエンテロキナーゼにより特異的に開裂され、チオレドキシンの開裂されないため、活性部位ループに挿入されたペプチドが融合蛋白の表面に存在することを示している。

下記実施例5でより詳細に記載されている通り、小ペプチドの融合はチオレドキシンの活性部位ループに為された。挿入されたペプチドは14残基長であって、全体的にランダムな組成を有しており、疎水性、親水性および中性配列とのシステムの対処能力が試験された。

この発明の方法および組成物により、研究、診断および治療分野に有用な蛋白およびペプチドの製造が可能となる。この発明による融合蛋白の製造は若干の利点を有する。一例として、エシェリキア・コリのチオレドキシンの融合蛋白または別のチオレドキシンの融合蛋白へのカルボキシル末端融合としての本発明による選択した蛋白の製造により、エシェリキア・コリでの真核生物蛋白製造において直面することが多い翻訳開始問題が回避され得る。さらに、通常異種蛋白のアミノ末端に残存する開始物質ノチオニンは存在せず、異種蛋白がカルボキシル末端チオレドキシンの融合体として生産される場合には除去される必要はない。

この発明による融合蛋白の製造により、目的異種蛋白の溶解性は確実に改善され、発現系でのプロテアーゼに対するそれらの安定性は高められる。またこの発

明は、他の方法では細菌宿主細胞において低レベルでしか製造されないある種の望ましい治療用蛋白、例えばIL-11の高レベルの発現を可能にする。

また、この発明は、特に異種蛋白自体が熱安定性である場合、融合蛋白に熱安定性を付与し得る。チオレドキシンのように恐らくは全チオレドキシンの融合蛋白は80℃以下で熱安定性であるため、本発明は、チオレドキシンの融合蛋白によっては初期有効製剤段階としての単純な熱処理の使用を可能にする場合がある。

治療または他の用途に関して融合蛋白からの開裂時における高レベルの選択した異種蛋白またはペプチドの提供に加えて、本発明の融合蛋白または融合ペプチドはそれら自体治療薬として有用であり得る。さらに、チオレドキシンの融合蛋白は、生物活性ペプチド送達用ベクターを提供し得る。一例として、ひとチオレドキシンのようにひとにおいて抗原性を示さないため、ひとチオレドキシンの本発明融合蛋白は、それが融合される生物活性ペプチドのひとへの送達用ベクターとして有用であり得る。ひとチオレドキシンの融合蛋白は細胞内蛋白であるため、ひとチオレドキシンの融合蛋白はエシェリキア・コリ細胞内発現系で製造され得る。すなわち、この発明はまた、許容し得るチオレドキシンの融合蛋白との融合蛋白形態での患者への生物活性ペプチドまたは蛋白の送達方法を提供する。

また本発明は、潜在的酵素阻害、ホルモン/生長因子アゴニストおよびホルモン/生長因子拮抗活性に関してランダムペプチドのライブラリーをスクリーニングするための方法および試薬を提供する。また、レセプター結合部位、基質結合部位、燐酸化/修飾部位、プロテアーゼ開裂部位およびエピトープを含め、潜在的興味の対象である領域に関する既知蛋白配列の地図作製方法および試薬も提供される。

チオレドキシンのランダムペプチド融合蛋白を発現する細菌コロニーは、プローブとして放射性標識蛋白、例えばホルモンまたは生長因子を用いてスクリーニングされ得る。このタイプのスクリーンから生じる陽性は、レセプター結合部位の標識を固定し、治療用途を有する化合物の設計が誘導され得る。また、チオレドキシンのランダムペプチド融合蛋白を発現する細菌コロニーは、天然活性ホ

トリー・マニュアル、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ニューヨーク(1989)により充分に記載された標準DNA操作技術を使用することにより様々な関連エシェリキア・コリ発現プラスミドを構築した。

別の配列とは融合せずにエシェリキア・コリtrxA遺伝子を含む第1発現プラスミドpALTtrxA-7.81を構築した。このプラスミドは、さらに関連IL-11融合プラスミドに関して詳細に記載されている配列を含んでいた。エシェリキア・コリ宿主株G1724においてチオレドキシンとして全細胞蛋白の>10%の蓄積を指向するこの第1プラスミドを下記要領でさらに操作することにより、trxA/IL-11融合配列を構築した。

図1に示されている関連プラスミド発現ベクターpALTtrxA/EK/IL11ΔPro-581の全配列は、下記の主な特徴を含む。

ヌクレオチド1-2060は、宿主エシェリキア・コリ株において抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与するβ-ラクタマーゼの遺伝子を含む配列およびcolE1由来の複製開始点を含む、プラスミドpUC-18[ノランダー等、「ジーン」26:101-106(1983)]を起源とするDNA配列を含む。ヌクレオチド2061-2221は、3つのオペレーター配列O₁、O₂およびO₃を含む、バクテリオファージλ[サンガー等、「ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー」162:729-773(1982)]の主な左方向プロモーターに関するDNA配列を含む。オペレーターはλcIレプレッサー蛋白に関する結合部位であり、その細胞内レベルはpLからの転写開始量を制御する。ヌクレオチド2222-2241は、バクテリオファージT7[ダンおよびステューディア、「ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー」166:477-535(1983)]の遺伝子10の配列に由来する強いリボソーム結合配列を含む。

ヌクレオチド2242-2568は、エシェリキア・コリのチオレドキシン蛋白をコード化するDNA配列を含む[リム等、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」163:311-316(1985)]。このプラスミドにおけるチオレドキシン暗号化配列の末端に翻訳終止コドンが存在しない。

Pro-581をエシェリキア・コリ宿主株G1724(F⁻, lac⁺, lacP⁺, aapC::λcI⁺)中に形質転換した。非形質転換宿主エシェリキア・コリG1724は、適用可能な法律および規則に準ずる特許目的のためATCCナンバー55151として1991年1月31日付けでメリーランド、ロックビル、12301パークローン・ドライブのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託された。0.5%w/vグルコース、0.2%w/vカサミノ酸および100μg/mlアンピシリンを補ったM9培地[ミラー、「エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ニューヨーク(1972)]により構成される、IMC培地を含む1.5%w/v寒天プレートにおいて形質転換体を選択した。

G1724は、aapC遺伝子座の染色体へ安定した状態で組み込まれた野生型λcIレプレッサー遺伝子のコピーを含み、前記遺伝子座においてそれはサルモネラ・ティフィムリウムtrpプロモーター/オペレーター配列の転写制御下に置かれている。G1724において、λcI蛋白は、トリプトファン不含有培地、例えば最少培地または上記のカサミノ酸、例えばIMCを補った最少培地における生長期間中のみ製造される。G1724の培養にトリプトファンを加えると、trpプロモーターは抑制され、λcIの合成は停止し、pLプロモーターが細胞に存在する場合それらからの転写誘導が徐々に誘発される。

pALTtrxA/EK/IL11ΔPro-581により形質転換されたG1724をIMC培地中37℃で0.5のA₅₅₀に生長させた。トリプトファンを加えて100μg/mlの最終濃度とし、培養物をさらに4時間インキュベーションした。この時間中、チオレドキシン-IL-11融合蛋白は、全細胞蛋白の約10%まで蓄積した。

融合蛋白は全て、可溶性細胞フラクションであることが見出され、次の要領で精製された。細胞を、フレンチ高圧セルにおいて50ミリモルHEPES(pH8.0)、1ミリモルのフェニルメチルスルホニルフルオリド中20000psiで溶解した。30分間15000gでの遠心分離によりリゾイトを浄化し、上清をQA

ヌクレオチド2569-2583は、短い親水性の柔軟なスパーサーペプチド「-GSGSG-」に関するアミノ酸配列をコード化するDNA配列を含む。ヌクレオチド2584-2598は、エンテロキナーゼ(EC3.4.4.8)の開裂認識部位「-DDDDK-」に関するアミノ酸配列をコード化するDNA配列を提供する[マロー等、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」246:5031-5039(1971)]。

ヌクレオチド2599-3132は、天然蛋白から通常見出されるN-末端プロリン残基について欠失した、成熟したIL-11[バウル等、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ」87:7512-7516(1990)]の修飾形態のアミノ酸配列をコード化するDNA配列を含む。この配列は、IL-11配列の3'-末端に翻訳終止コドンを含む。

ヌクレオチド3133-3159は、制限エンドヌクレアーゼ部位を含む「リシナー」DNA配列を提供する。ヌクレオチド3160-3232は、エシェリキア・コリaspA遺伝子[タカギ等、「ヌクレイック・アシッド・リサーチ」13:2063-2074(1985)]の配列に基づいた翻訳終止配列を提供する。ヌクレオチド3233-3632は、pUC-18に由来するDNA配列である。

下記実施例2に記載されている通り、適当なエシェリキア・コリ宿主株において適当な条件下で培養すると、このプラスミドベクターは、チオレドキシン-IL-11融合蛋白の高レベル(全細胞蛋白の約10%)の製造を指令し得る。反対に、チオレドキシンに融合していないとき、IL-11は、類似宿主/ベクター系で発現する場合に全細胞蛋白の0.2%までしか蓄積しなかった。

実施例2

融合蛋白の発現

チオレドキシン-IL-11融合蛋白は、実施例1の記載に従い構築されたプラスミドを用いたプロトコルに従って製造された。ゲジェットおよびエールリッヒ、「ジーン」6:23(1979)の方法により、pALTtrxA/EK/IL11Δ

E-トヨパール・カラムに充填した。フロー・スルー・フラクションを廃棄し、融合蛋白を50ミリモルHEPES(pH8.0)、100ミリモルNaClにより溶離した。溶離液を2モルNaClに調製し、フェニル・トヨパール・カラムに充填した。フロー・スルー・フラクションを再び廃棄し、融合蛋白を50ミリモルHEPES(pH8.0)、0.5モルNaClにより溶離した。

次いで、融合蛋白を25ミリモルHEPES(pH8.0)に対して透析すると、この段階で純度は>80%であった。T1165バイオアッセイ[バウル等、前出]によると、精製チオレドキシン-IL-11蛋白は8×10⁴U/μgの活性を呈した。この値は、モルに基づく、均一に精製されたCOS細胞由来のIL-11に関して見出され、同様に活性に関して測定された2×10⁴U/μgの活性と厳密に一致する。次いで、1ミリグラムの融合蛋白を、37℃で20時間1mlのトリス-Cl(pH8.0)/10ミリモルのCaCl₂中1000単位の牛エンテロキナーゼ[レイプニクスおよびライト、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」254:1677-1683(1979)]により開裂した。それらを25ミリモルHEPES(pH8.0)中QAE-トヨパール・カラムに通すごとにより、IL-11を反応産物から回収すると、フロー・スルー・フラクションからIL-11が見出された。非開裂融合蛋白、チオレドキシンおよびエンテロキナーゼはカラムに結合した状態で残存していた。

この方法で製造された均一なIL-11は、T1165検定において2.5×10⁴U/μgの生物活性を有していた。その物理的および化学的特性を次の要領で決定した。

(1)分子量

シャガー等、「アナリティカル・バイオケミストリー」166:368-379(1987)の方法に従い非還元条件下(トリシン・システム)10%SDS-PAGEで測定されたところによると、IL-11の分子量は約21kDであることが見出された。化合物は単一バンドとして動いた。

(2)エンドトキシン含有量

IL-11のエンドトキシン含有量は、製造者の指示に従って行われた、LAL(リムス錠形細胞ゼイト、ピロテル、アメリカ合衆国マサチューセッツ、ウッズ・ホールのアソーシエイツ・オブ・ケープ・コッド、インコーポレイテッドから入手可能)検定において1ミリグラムのIL-11当たり0.1ナノグラム未満であることが見出された。

(3)等電点

IL-11の理論的等電点はpH11.70である。pH範囲が3.5~9.5のLKBアンフォリンPAGプレートを用いたポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動により測定されたところによると、IL-11は9.5より大で動いた。利用できる信頼性のあるゲルにとってIL-11は高すぎる塩基性の蛋白であるため、正確な測定値は得られなかった。

(4)蛍光吸収スペクトル

1cm石英セルにおける0.1%水溶液で測定されたところによると、IL-11の蛍光吸収スペクトルは、335~337nmで最大放出を示した。

(5)UV吸収

1cm石英セルにおける0.1%水溶液でのIL-11のUV吸収は、278~280nmで最大吸収を示した。

(6)アミノ酸組成

アミノ酸配列に基づいたIL-11に関する理論的アミノ酸組成は次の通りである。

| アミノ酸 | 数 | モル% |
|-------|----|-------|
| Ala | 20 | 11.3 |
| Asp 酸 | 11 | 6.22 |
| Gly | 0 | |
| Glu | 3 | 1.70 |
| Phe | 1 | 0.57 |
| Gly | 14 | 7.91 |
| His | 4 | 2.26 |
| Ile | 2 | 1.13 |
| Lys | 1 | 0.57 |
| Leu | 41 | 23.16 |
| Met | 2 | 1.13 |
| Asn | 1 | 0.57 |
| Pro | 21 | 11.86 |
| Gln | 7 | 3.96 |
| Arg | 18 | 10.17 |
| Ser | 11 | 6.22 |
| Thr | 9 | 5.09 |
| Val | 5 | 2.83 |
| Trp | 3 | 1.70 |
| Tyr | 1 | 0.57 |

均質なIL-11の試料を、次の要領で蒸気相加水分解に付した。

6NのHClおよび2Nのフェノール試薬を、濃縮乾燥された、1:10希釈(1/10 H₂O)IL-11、45μlを含む管が挿入されている加水分解容器に加えた。試料を真空下密封し、110℃で36時間加水分解した。加水分解後、試料を乾燥し、500μl Na₂S試料希釈液に再懸濁した。ベックマン7300自動式アミノ酸分析装置においてアミノ酸分析を行った。カチオン交換カラムを使用して、ニンヒドリンによる後のカラム誘導体化後にアミノ酸を分離した。1次アミノ酸は570nmで検出され、2次アミノ酸は440nmで検出された。8点校正曲線をアミノ酸の各々に関して作製した。

ある種のアミノ酸は一般的には回収されないため、5アミノ酸のみに関する結果を下記に示す。蛋白を破壊せずに加水分解を行ったため、ほとんどのアミノ酸に関して100%回収が達成された。

GLX=10(cDNA配列に基づいたIL-11におけるグルタミンおよびグルタミン酸残基の予測された数)を正規化することにより、1分子の組換えIL-11当たりの個々の各アミノ酸残基の相対回収率を決定した。ピコモルでのGLXの回収率に関して得られた値を10で割ると、GLX指数が得られた。各アミノ酸のピコモルでの回収に関して得られた値をGLX指数で割ると、GLX残基の定量的回収率に正規化された、試料中の各アミノ酸の相対回収率を表す数値が与えられる。観察された各アミノ酸の残基の平均数に対する予測値を比較する相関係数は0.985より大きく、各アミノ酸について観察された残基の数が予測された配列と充分に一致することを示している。

| 0アミノ酸 | 1計算された残基数 | 2予測された残基数 | 3相関係数 |
|-------|-----------|-----------|--------|
| 1 Asp | 12.78 | 12 | |
| 2 Glu | 10.00 | 10 | |
| 3 Gly | 12.80 | 14 | 0.9852 |
| 4 Arg | 16.10 | 18 | |
| 5 Pro | 18.40 | 21 | |

(7)アミノ末端配列決定

ABI 471A蛋白配列決定装置(ABI、インコーポレイテッド)を用いて、製造者の指示に従いIL-11(95%アセトニトリルTFA中で緩衝状態)の配列決定を行った。アミノ末端配列決定により、チオレドキシン融合蛋白製造IL-11は正確なIL-11アミノ酸配列を含み、唯一のアミノ末端が観察されることが確認された。

(8)ペプチドマッピング

37℃で4時間10ミリモルのトリス、pH8、1モルの尿素および2ミリモルの4-アミノベンズアミジン・ジ塩酸塩(PABA)中エンドプロテイナーゼA sp-N(ベリンガー・マンハイム)(1:500のA sp-N対IL-11比)によりIL-11を開裂した。次いで、試料を、dH₂O中50ミリモルのNaH₂PO₄、pH4.3のA緩衝液、100%イソプロパノールのB緩衝液を用いて1ml/分で100%Aから25%Aおよび75%Bへの勾配(1%変化/分)によるC4バイダック・カラムにおけるHPLCにかけた。次いで、ABI 471A蛋白配列決定装置(ABI、インコーポレイテッド)を用いて、製造者の指示に従い溶解したペプチド・フラグメントの配列決定を行った。ペプチドマッピングにより、チオレドキシン融合蛋白から製造されたIL-11は適切なIL-11N-末端およびC-末端配列を含むことが確認された。

(9)溶解性

下記物質中における溶解性についてIL-11蛋白を試験すると、次の結果が得られた。

| | |
|-----------------------|----------|
| 水 | 非常に高い溶解性 |
| エチルアルコール | 非常に高い溶解性 |
| アセトン | 非常に高い溶解性 |
| 1モルの塩化ナトリウム | 非常に高い溶解性 |
| 10%シロ | 非常に高い溶解性 |
| (10)組成および蛋白/多糖類含有率(%) | |

IL-11 蛋白のポリペプチド・バックボーンに結合した糖部分の非存在は、典型的な糖結合部位を全く含まないそのアミノ酸配列により示される。

実施例3

チオレドキシン-MIP融合分子

ひとマクロファージ炎症性蛋白1 α (MIP-1 α)は、上記実施例1記載のpALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581と類似しているが、バクテリオファージT7のリボソーム結合部位をLCIIのそれと置き換えるべく下記方法で修飾した発現ベクターを用いることにより、チオレドキシン融合蛋白としてエシェリキア・コリにおいて高レベルで発現された。実施例1のプラスミドでは、慣用的手段によりヌクレオチド2222および2241を除去した。前出のサンガー等(1982)による記載に従いバクテリオファージ・ラムダからのヌクレオチド35566~35472および38137~38361により形成されたヌクレオチド配列を、それらのヌクレオチドの代わりに挿入した。この配列を開示する目的で、この参考文献を引用して説明の一部とする。チオレドキシン-MIP-1 α 融合蛋白を発現させるため、ひとIL-11をコード化するようして修飾されたpALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581におけるDNA配列(ヌクレオチド2599-3132)を、完全長成熟ひとMIP-1 α [中尾等、「Mol. Cell. Biol.」10:3646-3658(1990)]をコード化する図2に示された213ヌクレオチドDNA配列により置き換える。

チオレドキシン-MIP-1 α 融合蛋白の製造に使用された宿主株および発現プロトコルは、実施例1に記載されている。チオレドキシン-IL-11融合蛋白の場合から明らかなことであるが、チオレドキシン-MIP-1 α 融合蛋白は全て可溶性細胞フラクションから見出し、全蛋白の20%以下を占める。

実施例1の場合と同様に細胞を溶解すると、粗リゼイト中で10mg/mlの蛋白濃度で得られた。次いで、このリゼイトを10分間80℃で加熱すると、汚染性エシェリキア・コリ蛋白の大多数が沈降し、60分間130000 \times gでの遠心分離により不純物が除去された。沈降物を廃棄し、上清をモノQカラムに充填し

た。融合蛋白はこのカラムから約0.5モルNaClで洗脱し、この段階での純度は>80%であった。透析により塩を除去後、融合蛋白は、実施例1記載のエントロキナーゼ処理により開裂され、MIP-1 α が放出され得る。

実施例4

チオレドキシン-BMP-2融合分子

ひと骨形成蛋白2(BMP-2)は、実施例3記載の修飾発現ベクターを用いることによりチオレドキシン融合蛋白としてエシェリキア・コリにおいて高レベルで発現された。修飾pALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581におけるひとIL-11をコード化するDNA配列(ヌクレオチド2599-3132)を、完全長成熟ひとBMP-2[ウェズニー等、「サイエンス」242:1528-1534(1988)]をコード化する図3に示された345ヌクレオチドDNA配列により置き換える。

この場合、発現ベクターを含む株G1724を、トリプトファンを含む培地において37℃で生長させると、チオレドキシン-BMP-2融合蛋白は不溶性細胞フラクション中に現れた。しかしながら、生長培地の温度を20℃に下げると、融合蛋白は可溶性細胞フラクションから見出された。

実施例5

チオレドキシン-小ペプチド融合分子

天然エシェリキア・コリのチオレドキシンは、ヌクレオチド2569-3129について欠失した実施例3記載の同プラスミド発現ベクターを含む株G1724を使用し、実施例1で概説された生長および調製プロトコルを用いることにより、エシェリキア・コリから高レベルで発現された。これらの条件下、チオレドキシンは全蛋白の約10%まで蓄積し、その全ては可溶性細胞フラクション中に存在した。

図4は、チオレドキシン蛋白配列の残基G₉₃およびP₉₄間における、オレドキシンの活性部位ループへのエントロキナーゼ開裂部位をコード化する13アミノ酸残基の挿入を示す。この内部エントロキナーゼ部位を含む融合蛋白は、天然

チオレドキシンと等しいレベルで発現され、上記実施例1で概説したエントロキナーゼ処理により開裂された。融合蛋白は、加熱処理に対して天然チオレドキシンと同程度に安定しており、実施例4に記載された通り80℃で10分間のインキュベーションに耐性を示すことが見出された。

下記に、G₉₃およびP₉₄間のチオレドキシンの活性部位ループに組み込まれた12の追加ペプチド挿入体を列挙する。配列は各々長さ14のアミノ酸残基であり、組成はランダムである。これらのランダムな挿入体を含むチオレドキシン融合蛋白の各々は、天然チオレドキシンと同等のレベルで生成された。それらは全て、可溶性細胞フラクションから見出された。これらのペプチドは、下記の配列を含む。

Pro-Leu-Gln-Arg-Ile-Pro-Pro-Gln-Ala-Leu-Arg-Val-Glu-Gly,
Pro-Arg-Asp-Cys-Val-Gln-Arg-Gly-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly,
Pro-Met-Arg-His-Asp-Val-Arg-Cys-Val-Leu-His-Gly-Thr-Gly,
Pro-Gly-Val-Arg-Leu-Pro-Ile-Cys-Tyr-Asp-Asp-Ile-Arg-Gly,
Pro-Lys-Phe-Ser-Asp-Gly-Ala-Gln-Gly-Leu-Gly-Ala-Val-Gly,
Pro-Pro-Ser-Leu-Val-Gln-Asp-Asp-Ser-Phe-Glu-Asp-Arg-Gly,
Pro-Trp-Ile-Asn-Gly-Ala-Thr-Pro-Val-Lys-Ser-Ser-Ser-Gly,
Pro-Ala-His-Arg-Phe-Arg-Gly-Gly-Ser-Pro-Ala-Ile-Phe-Gly,
Pro-Ile-Met-Gly-Ala-Ser-His-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Glu-Gly,
Pro-Asp-Ser-Leu-Arg-Arg-Glu-Gly-Phe-Gly-Leu-Leu-Gly,
Pro-Ser-Glu-Tyr-Pro-Gly-Leu-Ala-Thr-Gly-His-His-Val-Gly,
and Pro-Leu-Gly-Val-Leu-Gly-Ser-Ile-Trp-Leu-Glu-Arg-Gln-Gly.

挿入された配列は、疎水性および親水性の両方の例およびシステイン残基を含む例を含んでいた。チオレドキシンの活性部位ループは、可溶性融合蛋白を生成する広範な種類のペプチド挿入体に耐性を示し得ると思われる。標準的方法を用いることにより、これらのループ「挿入体」が精製され得る。

実施例6

ひとインターロイキン-6

ひとインターロイキン-6(IL-6)は、上記実施例3記載の修飾pALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581と類似した発現ベクターを用いることによりチ

オレドキシン融合蛋白としてエシェリキア・コリにおいて高レベルで発現された。チオレドキシン-IL-6融合体が発現させるため、ひとIL-11をコード化する修飾pALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581におけるDNA配列(ヌクレオチド2599-3132)を、完全長成熟ひとIL-6[平野等、「ネイチャー」324:73-76(1986)]をコード化する図6に示された561ヌクレオチドDNA配列により置き換える。チオレドキシン-IL-6融合蛋白の製造に使用される宿主株および発現プロトコルは、実施例1記載の通りである。

融合蛋白を37℃で合成する場合、その約50%は「細胞封入体」または不溶性フラクションから見出された。しかしながら、チオレドキシン-IL-6融合蛋白は全て、全細胞蛋白の10%以下を占めており、合成温度を25℃に下げると、可溶性フラクションから見出された。

実施例7

ひとマクロファージ・コロニー刺激因子

ひとマクロファージ・コロニー刺激因子(M-CSF)は、上記実施例3記載のpALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581と類似した修飾発現ベクターを用いることによりチオレドキシン融合蛋白としてエシェリキア・コリにおいて高レベルで発現された。

修飾pALtrxA/EK/IL11 Δ Pro-581においてひとIL-11をコード化するDNA配列(ヌクレオチド2599-3135)を、成熟ひとM-CSF β [G.G. ウォング等、「サイエンス」235:1504-1508(1987)]の最初の223アミノ酸をコード化する図7に示された669ヌクレオチドDNA配列と置き換える。チオレドキシン-M-CSF融合蛋白の製造に使用される宿主株および発現プロトコルは、上記実施例2の記載と同様であった。

チオレドキシン-IL-11融合蛋白の場合から明らかなことであるが、チオレドキシン-M-CSF融合蛋白は全て、可溶性細胞フラクションから見出され、全蛋白の10%以下を占めていた。

実施例8

浸透圧ショックまたは凍結/解凍による融合蛋白の放出

この発明によるチオレドキシンへの異種蛋白の融合が宿主細胞の付着部位に対する標的設定を可能にし、細胞から融合蛋白を放出させ得るか否かを決定するため、細胞を単純な浸透圧ショックおよび凍結/解凍方法にかけた。

下記方法では、野生型エシェリキア・コリのチオレドキシン、ひとチオレドキシン、エシェリキア・コリのチオレドキシン-MIP1α融合体またはエシェリキア・コリのチオレドキシン-IL-11融合体を過剰生産する細胞を使用した。

浸透圧ショック処理の場合、細胞を20ミリモルのトリス-CI、pH8.0/2.5ミリモルのEDTA/20%v/vしよ糖に2A₅₅₀/mlで再懸濁し、10分間氷上で保冷した。次いで、細胞を遠心分離(12000×g、30秒)により沈澱させ、上記と同じではあるがしよ糖を省いた緩衝液に徐々に再懸濁した。氷上でさらに10分間おいて蛋白を浸透圧により放出させた後、細胞を遠心分離(12000×g、2分間)により再沈澱させ、上清(「ショックート」(shockate))をその蛋白含有率について調べた。野生型エシェリキア・コリのチオレドキシンおよびひとチオレドキシンは定量的に放出され、>80%純粋チオレドキシンである「ショックート」製品を与えた。さらに重要なことに、チオレドキシン-MIP1αの>80%およびチオレドキシン-IL-6-11融合蛋白の>50%がこの浸透圧処理により放出された。

単純な凍結/解凍方法によっても類似した結果が得られ、チオレドキシン融合蛋白を選択的に放出し、壁の内側の他の細胞蛋白の大部分を喪失した。典型的な凍結/解凍方法では、細胞を2A₅₅₀/mlで20ミリモルのトリス-CI、pH8.0/2.5ミリモルのEDTAに再懸濁し、ドライアイスまたは液体窒素で感濁液を迅速に凍結させる。次いで、冷凍感濁液をゆっくりと解凍した後、細胞を回転(12000×g、2分間)させ、蛋白について上清を調べる。

生成した「ショックート」は追加的精製を必要とし得るが、初期「ショックート」は核酸汚染物質の非存在を特徴とする。初期リゼイトと比較すると、「ショック

ート」の純度は顕著に優れており、細菌リゼイトからのDNAの困難な除去を必要としない。

すなわち、この放出設備は、実施例2の凍結設備と置き換えられ得る。次いで、同実施例に開示された方法で遠心分離後に得られた上清はさらに精製される。

本発明の多くの修正および変形も本明細書に包含され、当業界の一般業者には明白なものであると予測される。本発明の組成物および方法に加えられるそれらの修正および改変もまた、後記請求の範囲に包含されると考えられる。

FIGURE 1A

DALRYMPLE/EE/ILLI. PRO-551

| | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|------|
| GAGGAAAGGG | CCTGTCATA | CGCCTATTCTT | TATAGGTAA | 40 |
| TGTCTAGATA | AAATAGCTTT | CTTAGAGCTC | AGGTGGCACT | 80 |
| TTTGGGGAAA | ATGTGGGGGG | AACCCCTATT | TGTTTATTCTT | 120 |
| TCTAAATACA | TTCAATATG | TATCCGCTCA | TGAGACAATA | 160 |
| ACCCGATAA | ATGCTTCAAT | AAATATGAAA | AAGGAAGAT | 200 |
| ATGAGCTTC | AACATTTCCG | TGTGGCCCTT | ATTCCTCTTT | 240 |
| TTGGCCGATT | TTGCCCTCTT | GTTTTCGCTC | ACCCAGAAAC | 280 |
| CGTGGTGAAA | GTAAAGATG | CTGAAGATCA | GTTGGGTGCA | 320 |
| CGAGTGGGTT | ACATCGAAT | GAATCTCAAC | AGCGGTGAGA | 360 |
| TGCTTGAGAG | TTTTCGCCCC | GAAGAACGTT | TTCCATGAT | 400 |
| GAGCACTTTT | AAAGTTCTGC | TATGTGGGCG | GATATTATCC | 440 |
| CGTATTGACG | CGGGCCAGGA | GCACTCGGCT | CGCCGCATAC | 480 |
| ACTATTCTCA | GAATGACTTG | GTTGAGTACT | CACCACTCAC | 520 |
| AGAAAGCAT | GTTACGGATG | GCACTGACAT | AACAGATTA | 560 |
| TGCAGTCTCT | CCATAACCAT | GAGTGATTAAC | ACTGGGGCCA | 600 |
| ACTTACTTCT | GACATCGATC | GGAGGACCGA | AGGAGCTAAC | 640 |
| CGCTTTTTCG | CACAACTGG | GGGATCACTT | AACTCGGCTT | 680 |
| GATCGTGGGG | AACCGGAGCT | GAATGAAGCC | ATACCAAAAG | 720 |
| ACGAGCGTGA | CACCAGATG | CCTGTAGCAA | TGGCAACAA | 760 |
| GTTGGCGAAA | CTATTAACTG | GCGAACTACT | TACTCTAGCT | 800 |
| TCCCGGCAAC | AATTAATAGA | CTGGATGAG | CGCGATAAAG | 840 |
| TTCAGGAGCC | ACTTCTGCGC | TGGGCGCTTC | CGGCTGGCTG | 880 |
| GTTTATTGCT | GATAAATCTG | GAGCGGCTGA | GCGTGGGCTT | 920 |
| CGCGTATCA | TTCAGCACT | GGGGCCAGAT | GCTAAGCCCT | 960 |
| CCCGTATCGT | AGTTATCTAC | ACGACGGGGA | GTCAGGCAAC | 1000 |
| TATGATGAA | CGAATAGAC | AGATCGCTGA | GATAGCTCC | 1040 |

FIGURE 1B

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------|
| TCACTGATTA | AGCATTCGTA | ACTGTGAGAC | CAAGTTTACT | 1080 |
| CATATATACT | TTGATTTGAT | TTAAAGCTTC | ATTTTTAAAT | 1120 |
| TAAAGGATC | TGGTGAGAGA | TGCTTTTGA | TAACTCATG | 1160 |
| ACCAAAATCC | CTTAACTGTA | GTTTTCGCTC | CAGTCAGCT | 1200 |
| CAGACCCCTG | AGAAAGATC | AAAGGATCTT | CTTAGATCC | 1240 |
| TTTTTTTCG | CGGTAATCT | GCTGCTGCA | AACAAATAA | 1280 |
| CCACGCTAC | CAGCGTGGT | TTGTTGCGG | GATCAGAGC | 1320 |
| TACCACTCT | TTTTCCGAG | GTAACTGCT | TCAGCAGAC | 1360 |
| GCAGATACCA | AACTCTGCT | TCTGCTGTA | CGCTTAGTTA | 1400 |
| GGCCACCACT | TCAAGACTC | TGTAGCACCG | CCTACATACC | 1440 |
| TGCTCTGCT | AACTCTGTA | CGAGTGGCTG | CTGCCAGTG | 1480 |
| CGATAAGTOS | TGCTTAGCG | GCTTGGACTC | AAGACGATAG | 1520 |
| TTACCGGATA | AGCGCCAGCG | GTCGGCTGA | ACGGGGGCTT | 1560 |
| CGTGACACA | CGCCAGCTTG | GAGCGAACGA | CCTACACOGA | 1600 |
| ACTGAGATAC | CTACAGCGTG | AGCATTTAGA | AAGCGCCAGG | 1640 |
| CTTCCCGAAG | CGAAGAGGC | GACAGGCTAT | CGCGTAGCG | 1680 |
| GCAGCGTGG | AACAGAGAG | CGCAGAGGG | AGCTTCCAGG | 1720 |
| GGGAAGCGC | TGCTATCTTT | ATAGTCTGCT | CGGGTTTGGC | 1760 |
| CACCTCTGAC | TTGAGCGCTG | ATTTTCTGA | TGCTGCTCAG | 1800 |
| GGGGCGGAG | CCTATGAAA | AACGCCAGCA | ACGGCGCTTT | 1840 |
| TTTACGGTTC | CTGGCTTTT | GCTGGCTTTT | TGCTCAGATG | 1880 |
| TCTTTTCTG | CGTTATCCCT | TGATTTCTG | GATAACGCTA | 1920 |
| TATACCGCTT | TGAGTGAGCT | GATACCGCTG | CGCGCAGCG | 1960 |
| AACGACGAG | CGCAGGAGT | CAGTGAGCGA | GGAAGCGGAA | 2000 |
| GAGCGCCAA | TACGCAAAAC | CGCTCTCTCC | CGCGTTGGC | 2040 |
| CGATTCATTA | ATGAGCAATT | GATCTCTCAC | CTACCAACAA | 2080 |
| ATGCCCCCT | CGAAATAATA | AATTCATATA | AAACACATAC | 2120 |

FIGURE 1C

AGATAACCAT CTGCGGTGAT AAATTATCTC TGGCGGTGTT 2160
 GACATAATA CCACTGCGCG TGATCTGAG CACATCAGCA 2200
 GGACCCACTG ACCACCATGA ATTCAAGAAG GAGATATACA 2240
 T ATG AGC GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC 2274
 Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp
 1 5 10
 AGT TTT GAC ACG GAT GTA CTC AAA CGG GAC GGG 2307
 Ser Phe Asp Thr Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly
 15 20
 CGC ATC CTC CTC GAT TTC TGG GCA GAG TGG TGC 2340
 Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp Cys
 25 30
 GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT 2373
 Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp
 35 40
 GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GCG AAA CTG ACC 2406
 Glu Ile Ala Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr
 45 50 55
 GTT CCA AAA CTG AAC ATC GAT CAA AAC CCT GGC 2439
 Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn Pro Gly
 60 65
 ACT CCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG 2472
 Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro
 70 75
 ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG CCG 2505
 Thr Leu Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala
 80 85
 GCA ACC AAA CTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG 2538
 Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser Lys Gly Gln
 90 95
 TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCC GGT 2571
 Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly
 100 105 110
 TCT GGT TCT GGT GAT GAC GAT GAC AAA GGT CCA 2604
 Ser Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
 115 120

FIGURE 1D

CCA CCA GGT CCA CCT CGA GTT TCC CCA GAC CCT 2637
 Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro
 125 130
 CGG CCG GAG CTG GAC AGC ACC GTG CTC CTG ACC 2670
 Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr
 135 140
 CGC TCT CTC CTG GCG GAC ACG CCG CAG CTG GCT 2703
 Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr Arg Arg Gln Leu Ala
 145 150
 GCA CAG CTG AGG GAC AAA TTC CCA GCT GAC GCG 2736
 Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly
 155 160 165
 GAC CAC AAC CTG GAT TCC CTG CCG ACC CTG GCC 2769
 Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala
 170 175
 ATG AGT GCG CCG GCA CTG GGA GCT CTA CAG CTC 2802
 Met Ser Ala Gly Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu
 180 185
 CCA GGT GTG CTG ACA AGG CTG CGA CCG GAC CTA 2835
 Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asp Leu
 190 195
 CTG TCC TAC CTG CCG CAC GTG CAG TGG CTG CCG 2868
 Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg
 200 205
 CCG CCA GGT GCG TCT TCC CTG AAG ACC CTG GAG 2901
 Arg Ala Gly Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu
 210 215 220
 CCC GAG CTG GCG ACC CTG CAG GCC CGA CTG GAC 2934
 Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu Asp
 225 230
 CCG CTC CTG CCG CCG CTG CAG CTC CTG ATG TCC 2967
 Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser
 235 240 245
 CCG CTC GCC CTG CCC CAG CCA CCC CCG GAC CCG 3000
 Arg Leu Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro
 245 250 255
 CCG GCG CCC CCG CTG GCG CCC CCC TCC TCA GCC 3033
 Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser Ser Ala
 255 260

FIGURE 1E

TGG GGG GGC ATC AGG GCC GCC CAC GCC ATC CTG 3066
 Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu
 265 270 275
 GGG GGG CTG CAC CTG ACA CTT GAC TGG GCC GTG 3099
 Gly Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val
 280 285
 AGG GGA CTG CTG CTG CTG AAG ACT CCG CTG TGA 3132
 Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr Arg Leu
 290 295
 AAGCTTATCG ATACCGTCCA CCGCAGTAA TCGTACAGGG 3172
 TAGTACAAAT AAAAAAGCCA CGTCAGATGA CGTCCCTTTT 3212
 TTCTGTGAG CAGTAAGCTT GGCACGCGC GTGCTTTTAC 3252
 AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCGAAGTTAA 3292
 TCGCCTTGCA GCACATCCCC CTTTGGCCAG CTGGCGTAAT 3332
 AGCGAAGAGG CCGGCACCGA TCGCCCTTCC CAACAGTTGC 3372
 GCAGCCCTGAA TGGCGAATGG CGCCTGATGC GGTATTTTCT 3412
 CCTTACGCAT CTGTCCGGTA TTTCACACCG CATATATGGT 3452
 GCACTCTCAG TACAATCTGC TGTGATGCCG CATAGTTAAG 3492
 CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA 3532
 CCGGCTTTGC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG 3572
 TGACCGTCTC CCGGAGCTGC ATGTGTCAGA GGTTTTCACC 3612
 GTCATCACCG AAACGCGGA 3632

FIGURE 2

MIP-1a

GCA CCA CTT GCT GCT GAC ACG CCG ACC GCC TGC TGC 36
 Ala Pro Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys
 1 5 10
 TTC AGC TAC ACC TCC CGA CAG ATT CCA CAG AAT TTC 72
 Phe Ser Tyr Thr Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe
 15 20
 ATA GCT GAC TAC TTT GAG ACG AGC AGC CAG TGC TCC 109
 Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln Cys Ser
 25 30 35
 AAG CCC AGT GTC ATC TTC CTA ACC AAG ACA GGC CCG 145
 Lys Pro Ser Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg
 40 45
 CAG GTC TGT GCT GAC CCC AGT GAG GAG TGG GTC CAG 181
 Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln
 50 55 60
 AAA TAC GTC AGT GAC CTG GAG CTG AGT GCC TAA 214
 Lys Thr Val Ser Asp Leu Glu Leu Ser Ala
 65 70

FIGURE 3

BRP-2

| | |
|---|-----|
| CAA GCT AAA CAT AAA CAA CGT AAA CGT CTG AAA TCT | 36 |
| Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser | |
| 1 | 10 |
| AGC TGT AAG AGA CAC CCT TTG TAC GTG GAC TTC AGT | 72 |
| Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser | |
| 15 | 20 |
| GAC GTG GGG TGG AAT GAC TGG ATT GTG GCT CCC CCG | 109 |
| Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro | |
| 25 | 35 |
| GGG TAT CAC GCC TTT TAC TGC CAC GGA GAA TGC CCT | 145 |
| Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro | |
| 40 | 45 |
| TTT CCT CTG GCT GAT CAT CTG AAC TCC ACT AAT CAT | 181 |
| Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His | |
| 50 | 60 |
| GCC ATT GTT CAG ACG TTG GTC AAC TCT GTT AAC TCT | 217 |
| Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser | |
| 65 | 70 |
| AAG ATT CCT AAG GCA TGC TGT GTC CCG ACA GAA CTC | 253 |
| Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu | |
| 75 | 80 |
| AGT GCT ATC TCG ATG CTG TAC CTT GAC GAG AAT GAA | 289 |
| Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu | |
| 85 | 95 |
| AAG GTT GTA TTA AAG AAC TAT CAG GAC ATG GTT GTG | 325 |
| Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val | |
| 100 | 105 |
| GAG GGT TGT GGG TGT CCC TAG | 346 |
| Glu Gly Cys Gly Cys Arg | |
| 110 | |

FIG 5

エシェリキア・コリのチオレドキシン (trxA) の活性部位ループへのランダムペプチド挿入

trxA 活性部位ループ

RexII 切断

オリゴ

ランダム 2本鎖

trxA 活性部位ループへの挿入

| | |
|--|--------------------|
|GAGTGGTGGCGGTCCGTGCAAAATG.... | |
|CTCACCACGCCAGGCACGTTTAC.... | |
|E W C G P C K M | |
| 31 | 38 |
|GAGTGGTGGCG | GTCCGTGCAAAATG.... |
|CTCACCACGCCAG | GCACGTTTAC.... |
|E W C G | P C K M |
| 31 | 38 |
| (AvaII) | AvaII |
| 5' GACTGACTGGTCCG... (N ₃₆)...GGTCTCTCAGTCAGTCAG 3' | |
| 3' CCAGGACTCAGTCAGTC 5' | |
| GTCCG... (N ₃₆)...C | |
| GC... (N ₃₆)...CCAG | |
|GAGTGGTGGCGGTCCG... (N ₃₆)...GGTCCGTGCAAAATG.... | |
|CTCACCACGCCAGGC... (N ₃₆)...CCAGGCACGTTTAC.... | |
|E W C G P... (X ₁₂)... G P C K M | |
| 31 | 38 |

FIG 4

エシェリキア・コリのチオレドキシン (trxA) の活性部位ループへのエンテロキナーゼ部位の挿入

trxA 活性部位ループ

RexII 切断

エンテロキナーゼ部位 (13 残基)

エンテロキナーゼ部位

| | |
|---|--------------------|
|GAGTGGTGGCGGTCCGTGCAAAATG.... | |
|CTCACCACGCCAGGCACGTTTAC.... | |
|E W C G P C K M | |
| 31 | 38 |
|GAGTGGTGGCG | GTCCGTGCAAAATG.... |
|CTCACCACGCCAG | GCACGTTTAC.... |
|E W C G | P C K M |
| 31 | 38 |
| gtcactccgactacaaagacgacgacgacaaagcttctg | |
| tgagggtgatgtttctgctgctgctgttctgaagaccag | |
|E S D Y K D D D D K A S G... | |
| 31 | 38 |

FIGURE 6

IL-6

| | |
|---|-----|
| ATG GCT CCA GTA CCT CCA GGT GAA GAT TCT AAA GAT GTA | 39 |
| Met Ala Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val | |
| 15 | 20 |
| GCC GCC CCA CAC AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA | 78 |
| Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg | |
| 30 | 35 |
| ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC CTC GAC GGC ATC TCA | 117 |
| Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser | |
| 40 | 45 |
| GCC CTC AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC ATG TGT | 156 |
| Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys | |
| 55 | 60 |
| GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG AAC | 195 |
| Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn | |
| 65 | 70 |
| CTT CCA AAG ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC CAA TCT | 234 |
| Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser | |
| 80 | 85 |
| GGA TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT | 273 |
| Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr | |
| 95 | 100 |
| GCT CTT TTG GAG TTT GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG | 312 |
| Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Thr Leu Gln | |
| 105 | 110 |
| AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG GAA CAA GCC AGA GCT GTG | 351 |
| Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val | |
| 120 | 125 |
| CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA | 390 |
| Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys | |

FIGURE 6 (continued)

130 140 150
AAG GCA AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC ACC CCF GAC CCA 429
Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro

155 160
ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACC AAG CTG CAG GCA CAG 468
Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln

170 175 180
AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG 507
Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu

185 190
CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG AGG GCT 546
Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala

195
CTT GGC CAA ATG TAG 561
Leu Arg Gln Met *

FIGURE 7

1 GAAGAAGTTT CTGAATATTG TAGCCACATG ATTGGGAGTG GACACCTGCA
51 GTCTCTGCAG CGGCTGATTG ACAGTCAGAT GGAGACCTCG TGCCAAATTA
101 CATTTCAGTT TGTAGACCAG GAACAGTTGA AAGATCCAGT GTGCTACCTT
151 AAGAAGCCAT TTCTCCTGGT ACAAGACATA ATGAGGACA CCATGCGCTT
201 CAGAGATAAC ACCCCCAATG CCATGCGCAT TGTGCGAGTG CAGGAAGCTT
251 CTTTGAGGCT GAAGAGCTGC TTCACCAAGG ATTATGAAGA GCATGACAAG
301 GCGTCGCTCC GAACCTTCTA TGAGACACCT CTCAGTTGC TCGAGAAGGT
351 CAAGAATGTC TTTAATGAAA CAAGAATCT CATTGACAG GACTGGAATA
401 TTTTCAGCAA GAACGCAAC AACAGCTTTC CTGAATGCTC CAGCCAGAT
451 GTGCTACCA AGCCTGATG CAACCTGCTG TACCCCAAG CCATCCCTAG
501 CAGTGACCGG GCGCTGTCTT CCGCTCATCA GCGCTGCGC CCGTCCATGG
551 CCGCTGTGCG TGGCTTGACC TGGGAGGACT CTGAGGGGAC TGAGGGCAGC
601 TCCTCTGTGC CTGGTGAGCA GCGCCTGCAC ACAGTGGATC CAGGCAATGC
651 CAAGCAGCGG CCACCCAGG

要 約

この発明は、選択した異種ペプチドまたは蛋白をコード化するDNA配列に融合したチオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列を含む融合分子を提供する。ペプチドまたは蛋白は、チオレドキシン様分子のアミノ末端、チオレドキシン様分子のカルボキシル末端、またはチオレドキシン様分子内、例えば前記分子の活性部位ループに融合される。望ましい宿主細胞においてその発現を指示する能力をもつ調節配列の制御下におけるこの融合分子の発現により、高レベルの安定した可溶性融合蛋白が製造される。細胞の細胞質に存在する融合蛋白は、浸透圧ショックまたは凍結/解凍方法により選択的に細胞から放出され得る。それは、所望により、開裂の結果、チオレドキシン様蛋白から可溶性の正確に折り畳まれた異種蛋白を遊離させ得る。

手続補正書

平成 5 年 4 月 20 日 通

特許庁長官殿

1. 事件の表示

PCT/US92/00944

2. 発明の名称

チオレドキシンおよびチオレドキシン様分子に対するペプチドおよび蛋白融合

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ジェネティックス・インスティテュート・インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号
ツイン21 MIDタワー内 電話(06)949-1261
FAX(06)949-0361

氏名 弁護士(6214) 青 山 薫

5. 補正命令の日付

自 発(審査請求と同時に)

6. 補正の対象

請求の範囲

7. 補正の内容

別紙の通り



(14)

特表平5-507209

特表平5-507209 (14)

(別紙)

請求の範囲

- (1) 選択した異種蛋白をコード化するDNA配列に融合したチオレドキシン様蛋白をコード化するDNAを含む、融合蛋白をコード化するDNA配列。
- (2) チオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列が融合蛋白のアミノ末端を含む、請求項1記載のDNA配列。
- (3) チオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列が融合蛋白のカルボキシル末端を含む、請求項1記載のDNA配列。
- (4) チオレドキシン様蛋白をコード化するDNA配列がエシエリキア・コリ (E. Coli) チオレドキシンおよびチオレドキシンからなる群から選ばれる、請求項1、2または3記載のDNA配列。
- (5) 選択した蛋白をコード化するDNA配列がIL-11、IL-6、マクロファージ阻害蛋白1αおよび骨形態形成蛋白2からなる群から選ばれる、請求項1、2または3記載のDNA配列。
- (6) さらにチオレドキシン様蛋白をコード化するDNAと選択した異種蛋白をコード化するDNAの間に融合したリンカーDNA配列を含む、請求項1、2または3記載のDNA配列。
- (7) 配列が、選択した宿主細胞における融合蛋白の発現を指示する能力をもつ適当な発現制御配列の制御下にある、請求項1-6のDNA配列を含むプラスミドDNA分子。
- (8) 請求項7記載のプラスミドで形質転換されるか、またはそれをそのゲノム中へ組込まれた、エシエリキア・コリ (E. Coli) 宿主細胞。
- (9) (a) 適当な条件下、培地中で請求項8記載の宿主細胞を培養し、
(b) それにより産された融合蛋白を上記培地から採取し、
(c) 上記融合蛋白から選択した異種蛋白を切断し、
(d) 選択した異種蛋白を分離することを含む

選択した異種蛋白の製造法。

(10) 請求項9記載の方法で製造されるIL-11蛋白。

(11) チオレドキシン様蛋白がチオレドキシンである請求項9記載の方法。

国際調査報告

PCT/US 92/00944

| | |
|---|--|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to Paris Convention Classification and IPC: | |
| Int. Cl. 5 C12N15/62; | C07K15/00 |
| II. FIELDS SEARCHED | |
| Molecular Classification System | |
| Classification System | Classification System |
| Int. Cl. 5 | C12N ; C07K |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁾ | |
| Category ²⁾ | Class of Document ³⁾ , title indication, where appropriate, of the abstract paragraph ⁴⁾ |
| X | BIOCHEMISTRY, vol. 27, no. 5, 8 March 1988, EASTON, PA US pages 1401 - 1408; CHANG-JIN LIM ET AL.: 'Characterization of Escherichia coli-Anabaena sp. Hybrid "Hybrids"' see page 1401, right column, paragraph 1 - page 1402, left column, paragraph 1 see page 1403, left column, paragraph 2 |
| | 1-4,7,8 |
| IV. CERTIFICATION | |
| Date of the actual Completion of the International Search | Date of Mailing of the International Search Report |
| 03 AUGUST 1992 | 12 AUG 1992 |
| International Searching Authority | Signature of Authorizing Officer |
| EUROPEAN PATENT OFFICE | MONTERO LOPEZ B. <i>[Signature]</i> |

International Application No.

PCT/US 92/00944

| | |
|--|--|
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) | |
| Category ²⁾ | Class of Document ³⁾ , title indication, where appropriate, of the abstract paragraph ⁴⁾ |
| X | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 87, no. 19, October 1990, WASHINGTON US pages 7512 - 7516; S.R. PAUL ET AL.: 'Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic cytokine' see page 7512, right column, paragraph 1 see page 7515, right column, paragraph 2 - page 7516, left column, paragraph 2 |
| P,A | EP,A,0 425 821 (AJIMOTO CO., INC.) 8 May 1991 see claim 1 |
| | 10 |
| | 1 |

(15)

特表平5-507209

特表平5-507209 (15)

国際調査報告

US 9200944
SA 59373

This annex lists the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report.
The members are as mentioned in the European Patent Office (EPO) file on.
The European Patent Office is to be kept for data publication which are merely given for the purpose of information. 03/04/92

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family members | Publication date |
|---|---------------------|--------------------------|---------------------|
| EP-A-0425821 | 08-05-91 | JP-A- 3204818 | 06-09-91 |

For more details about this annex see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

第1頁の続き

⑩Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 1/21
15/70
C 12 P 21/02
// A 61 K 37/02
(C 12 N 15/62
C 12 R 1:19)
(C 12 N 1/21
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)

C

7236-4B

8214-4B

8314-4C

優先権主張 ⑩1991年8月14日⑩米国(US)⑩745,382

⑩発明者

ラバリー、エドワード・アール

アメリカ合衆国01876 マサチューセッツ、テュウクスベリー、グ
リーン・メドウ・ドライブ 90番

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.